

NANOENCAPSULACION DE CINAMALDEHIDO EN MATRICES DE OVOALBUMINA PARA SU VEHICULIZACION EN RECUBRIMIENTOS

Finos Marianela

Instituto de Tecnología de Alimentos ITA-FIQ-UNL

Área: Ingeniería

Sub-Área: Alimentos

Grupo: X

Palabras clave: Cinamaldehído, Ovoalbúmina, Nanogeles

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología aplicada a la industria alimentaria se presenta como una herramienta poderosa para incrementar la calidad de productos. Actualmente, la investigación en conservación de alimentos se ha centrado, en parte, en el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles innovadores. Desde este punto de vista, la incorporación de nanopartículas a los mismos, constituye una alternativa para otorgar nuevas propiedades con mínimo impacto en la percepción sensorial y en las características fisicoquímicas del producto (Rhima y col. 2013). Los sistemas biopoliméricos que dan origen a recubrimientos comestibles podrían ser utilizados como soporte o vehículos de nanopartículas que posean actividad de inhibir el desarrollo de microorganismos alterantes. Sin embargo, actualmente, el uso de agentes antimicrobianos se encuentra limitado por exigencias de los consumidores y entes reguladores, los que sugieren mayormente el empleo de compuestos bioactivos de origen natural (Tiwari y col. 2009). Desafortunadamente, la mayoría de estos compuestos antimicrobianos, presentan escasa solubilidad en medios acuosos y elevada volatilidad, lo que restringe su incorporación en formulaciones de recubrimientos comestibles. Estos podrían encontrar mayor número de aplicaciones si de alguna manera son convenientemente encapsulados. Una estrategia de encapsulación podría hacer uso de la capacidad intrínseca de unir ligandos hidrofóbicos que presentan algunas proteínas globulares, entre ellas, las albúminas (Perez y col. 2014).

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue brindar información experimental sobre la nanoencapsulación de un antimicrobiano natural, cinamaldehído (CIN: trans-3-fenol-2-propenal), utilizando dos tipos de matrices de ovoalbúmina, una nativa (OVA) y otra agregada térmicamente bajo la forma de nanogel (OVAn). El compuesto CIN es extraído del aceite esencial de canela, siendo altamente volátil e inhibidor activo del crecimiento microbiano (Tajkarimi y col. 2010). Como consecuencia de estos hechos, su nanoencapsulación podría ser beneficiosa para: (i) aumentar su solubilidad en medios acuosos, (ii) disminuir su volatilidad en diferentes formulaciones y/o promover su liberación controlada, (iii) potenciar sus propiedades antimicrobianas y (iv) disminuir su oxidación a ácido cinámico, lo que promovería la preservación de sus propiedades antimicrobianas.

Proyecto: PICT-2015-2961: "Recubrimientos comestibles nanocompuestos para la extensión de la vida útil de productos panificados"

Director del proyecto: Dr. Adrián A. Perez

Director del tesinista: Dr. Adrián A. Perez, **Co-director del tesinista:** MSc. Liliana G. Santiago

METODOLOGÍA

Materiales

Ovoalbúmina (OVA, pureza 98%) y cinamaldehído (CIN, pureza $\geq 95.0\%$) fueron adquiridos de Sigma Aldrich (USA). La sonda fluorescente ácido 1,8 anilino-naftalen sulfónico (ANS) fue comprada en Fluka Chemie AG (Suiza). Los nanogeles de OVA (OVAn) fueron obtenidos de acuerdo al método descrito por Sponton y col (2016) con algunas modificaciones. La distribución de tamaño de partícula (PSD) de OVA y OVAn fue determinada en un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK). Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

Nanoencapsulación de CIN en matrices de OVA y OVAn

El proceso de nanoencapsulación de CIN empleando OVA y OVAn fue seguido por espectroscopía de fluorescencia intrínseca. Para tal fin se realizaron titulaciones de dispersiones de OVA y OVAn a $1 \mu\text{M}$ (buffer fosfato 50 mM pH 7,0) con concentraciones crecientes de CIN en solución etanólica (0-200 μM). Los espectros de emisión se obtuvieron a una λ_{ex} : 295 nm (debido a Trp). Los datos se ajustaron al modelo de Scatchard modificado con el objeto de calcular la estequiometría de unión o número de moléculas de CIN unidas por unidad monomérica de OVA (n) y la constante de asociación (K_a), de acuerdo a:

$$[P] \cdot (1 - f_i) = \frac{[\text{CIN}]}{n'} \cdot \left(\frac{1}{f_i} - 1 \right) - \frac{1}{K_a \cdot n'} \quad ; \quad f_i = \frac{F - F_0}{F_{\text{max}} - F_0} \quad (1)$$

donde P_{total} es la concentración total de OVA u OVAn, $[\text{CIN}]$ es la concentración total de CIN, n es el número de moléculas de CIN unidas a OVA u OVAn a nivel de la saturación, K_a es la constante de afinidad, f_i es la fracción de sitios ocupados por CIN. Además, los datos de fluorescencia fueron expresados como intensidad de fluorescencia relativa, $\text{IFR}_{\text{Trp}} = \text{IF}/\text{IF}_0$, donde IF es la intensidad de fluorescencia a una dada concentración de CIN e IF_0 es la intensidad de fluorescencia de OVA u OVAn pura. Los ensayos intrínsecos se realizaron a diferentes temperaturas en el rango comprendido entre 15 y 45 $^{\circ}\text{C}$, con el objeto de obtener los parámetros termodinámicos involucrados en el proceso de encapsulación. Para ello se aplicaron las siguientes ecuaciones (Sponton y col. 2016):

$$\ln K_0 = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT} \quad ; \quad \Delta G^0 = -T \cdot \Delta S^0 + \Delta H^0 \quad (2)$$

Por otro lado, para conocer el modo de unión de CIN a OVA y OVAn se realizaron ensayos de fluorescencia extrínseca usando la sonda fluorescente, ácido 1,8 anilino-naftalen sulfónico (ANS). Para ello, se adicionaron 9 μl de ANS 15 mM a cada sistema mixto y se determinaron espectros de emisión a λ_{ex} : 390 nm (Hitachi F2000, Japón). A su vez, los resultados se expresaron en términos relativos como $\text{IFR}_{\text{ANS}} = \text{IF}_{\text{ANS}}/\text{IF}_{0\text{ANS}}$, siendo IF_{ANS} la intensidad de fluorescencia extrínseca a una dada concentración de CIN e $\text{IF}_{0\text{ANS}}$ es la intensidad de fluorescencia extrínseca de OVA u OVAn pura (Perez y col. 2014). Las determinaciones se realizaron a 25 $^{\circ}\text{C}$ al menos por triplicado.

Características fisicoquímicas de las matrices OVA y OVAn

La Fig. 1 presenta un resumen de algunas características fisicoquímicas de las matrices OVA y OVAn que se consideran relevantes en procesos de nanoencapsulación: PDS e IF_{ANS} , determinada como una medida de la hidrofobicidad superficial de las mismas (Perez y col. 2014). El análisis PSD en Volumen (%) arrojó los siguientes resultados (Fig. 1A): 9 ± 1 nm para OVA y 30 ± 1 nm para OVAn. Por otro lado, se observó que el proceso de obtención de OVAn provocó un incremento de

~6 veces IF_{ANS} , sugiriendo que su formación es debida en parte a la exposición y ensamblado de residuos hidrofóbicos inicialmente ocluidos en el interior de la proteína.

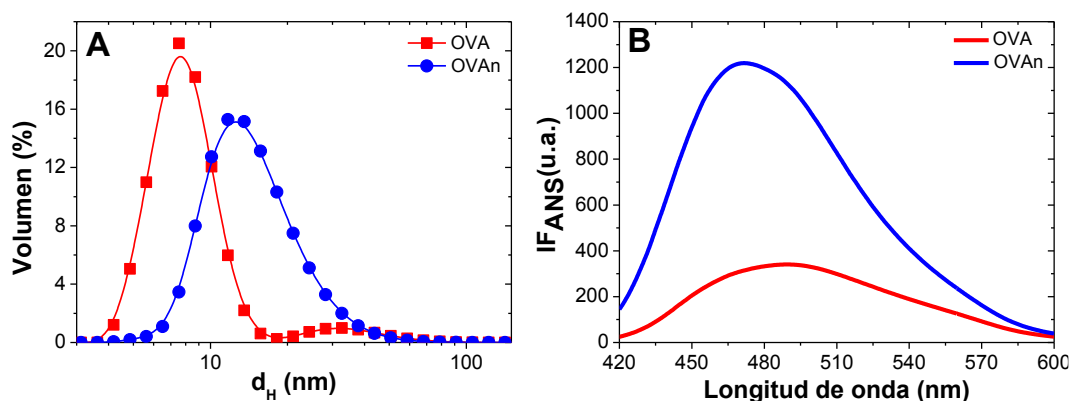


Figura 1: Distribución del tamaño de partícula en Volumen (%) (A) e Intensidad de emisión de fluorescencia extrínseca (IF_{ANS}) para OVA y OVAn. Temperatura 25°C, pH 7 (buffer fosfato 50 mM), concentración de proteína 1 μ M.

Por otro lado, el efecto de la concentración de CIN sobre la fluorescencia intrínseca y extrínseca de OVA y OVAn se presenta en la Fig. 2. Los insertos corresponden a la influencia de la concentración de CIN sobre IFR (tanto intrínseca como extrínseca). A partir de los datos de fluorescencia intrínseca se obtuvieron los siguientes valores de n y K_a : (i) Sistema OVA-CIN, n : 103 ± 9 y K_a : $(9,7 \pm 0,6) \times 10^6$ M, (ii) Sistema OVAn-CIN, n : 81 ± 3 y K_a : $(1,4 \pm 0,1) \times 10^6$ M. A partir de estos resultados puede deducirse que la nanoencapsulación de CIN se produce a nivel de un único dominio sobre un monómero de proteína a un orden de afinidad de unión similar (10^6 M). La reducción en número de moléculas de CIN nanoencapsuladas es explicada considerando que la formación de OVAn conlleva al empleo de residuos hidrofóbicos siendo algunos de ellos de relevancia para la unión de CIN. Sin embargo, de acuerdo al análisis PSD, OVAn estaría conformada por 44 monómeros de OVA (datos no mostrados), lo que supone la nanoencapsulación de 3580 moléculas de CIN, es decir, un aumento de ~35 veces la carga de OVA.

Por otro lado, como puede apreciarse en la Fig. 2, el aumento en la concentración de CIN influyó levemente sobre IF_{ANS} de OVA (2B), pero produjo una disminución gradual de IF_{ANS} de OVAn (2C). Por lo tanto, a partir de los insertos en las Fig. 2B y 2D pueden deducirse dos tipos de comportamientos o modos de unión: (i) para el caso de OVA, ANS desplazaría completamente a CIN superficialmente unido, o bien se uniría en un dominio diferente sobre la superficie de OVA indicando cierto nivel de especificidad molecular y (ii) para el caso de OVAn, el ANS se uniría a nivel de aquellos sitios hidrofóbicos que no fueron inicialmente ocupados por CIN, indicando que OVAn podría ser saturada por CIN mediante un mecanismo de “adentro hacia afuera” (Sponton y col. 2016).

Por último, a partir de las ecuaciones (2) se obtuvieron los parámetros termodinámicos involucrados en la nanoencapsulación de CIN. Para OVA-CIN se obtuvieron: ΔH^0 : -132,5 kJ/mol, ΔS^0 : 0,3 kJ/mol.K y $\Delta G^0_{25^\circ C}$: -40,2 kJ/mol. Por otra parte, para OVAn-CIN se obtuvieron: ΔH^0 : -4,8 kJ/mol, ΔS^0 : 0,4 kJ/mol.K y $\Delta G^0_{25^\circ C}$: -34,1 kJ/mol. Debido al signo de los parámetros termodinámicos, podría concluirse que la nanoencapsulación de CIN en estas matrices responde a un proceso espontáneo y exotérmico (Sponton y col. 2016). Diferencias en la magnitud de los mismos (mayormente en ΔH^0) sugeriría que la naturaleza termodinámica de la nanoencapsulación de CIN podría relacionarse con el diferente modo de unión observado para ambos tipos de matrices evaluadas, tal

como se discutió anteriormente.

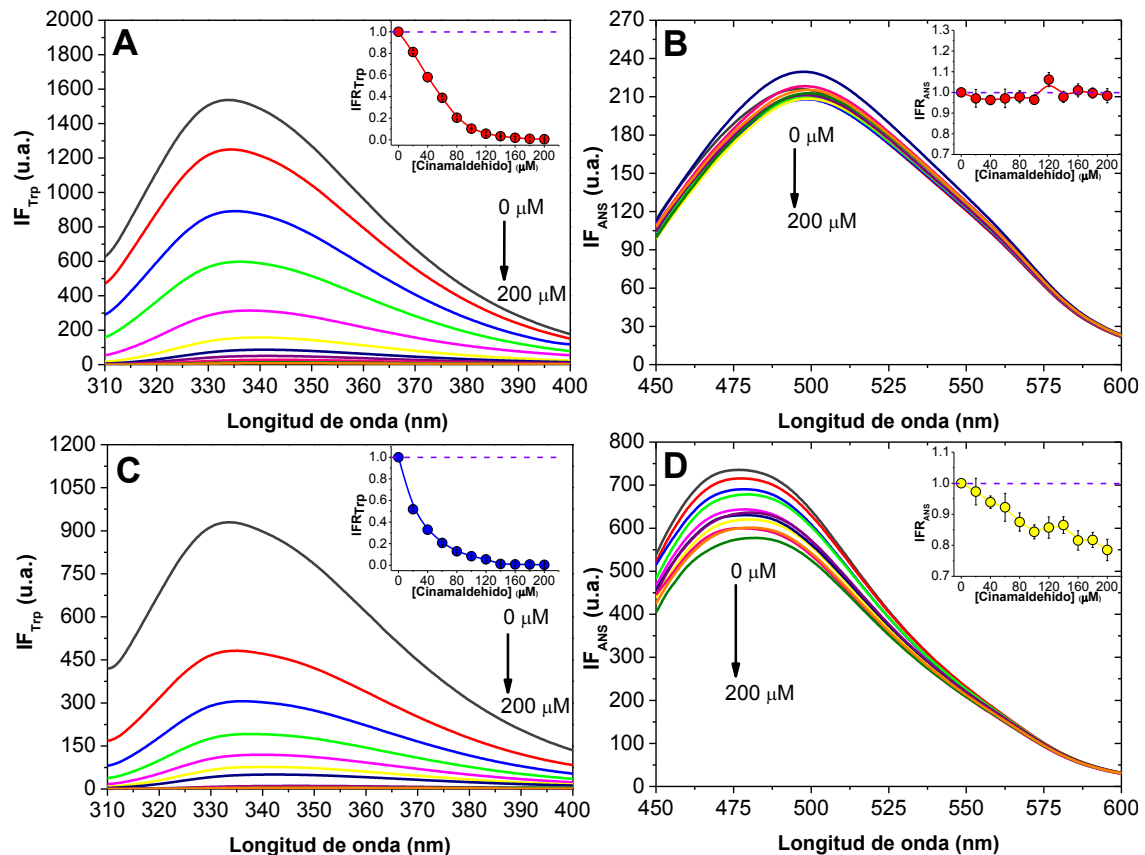


Figura 2: Efecto de la concentración de CIN (0 a 200 μM) sobre la emisión de fluorescencia intrínseca (IF_{TRP}) y extrínseca (IF_{ANS}) de Ovoalbúmina nativa (OVA: A y B, respectivamente) y nanogeles de Ovalbúmina (OVAn: C y D, respectivamente). Los insertos refieren a la intensidad de fluorescencia relativa tanto intrínseca (IFR_{TRP}) como extrínseca (IFR_{ANS}). Temperatura 25°C, pH 7 (buffer fosfato 50 mM), 1 μM OVA y OVAn.

En conclusión, la nanoencapsulación de CIN empleando como matrices OVA nativa y un nanogel OVAn, pudo ser descrita en términos moleculares, estequiométricos y termodinámicos. La formación de nanocarriers de CIN supone un potencial incremento de su solubilidad y retención en formulaciones de recubrimientos comestibles.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Perez A.A., Andermatten R.B., Rubiolo A.C., Santiago L.G., 2014. Beta-lactoglobulin heat-induced aggregates as carriers of polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 158, 66-72.
- Rhima J.W., Park H.H, Hac C.H., 2013. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, 38, 1629-1652.
- Sponton O.E., Perez A.A., Carrara C.R., Santiago L.G., 2016. Complexes between ovalbumin nanoparticles and linoleic acid: Stoichiometric, kinetic and thermodynamic aspects. *Food Chemistry*, 211, 819-826.
- Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., Cliver D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199-1218.
- Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O' Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J., 2009. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5987-6000.